

Efek Kombinasi Fraksi Alkaloid Ekstrak *Imperata cylindrica* L. dengan Amoksisilin atau Kloramfenikol terhadap Daya Hambat *Staphylococcus aureus*

Alma Nur Azizah, Arif Yahya, Rio Risandiansyah*

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan : Alkaloid merupakan senyawa yang terkandung dalam *Imperata cylindrica* L. (alang – alang). Ekstrak metanolik *I. cylindrica* L. diketahui berinteraksi dengan beberapa jenis antibiotik. Namun, belum ada penelitian yang membuktikan bahwa alkaloid dari *I. cylindrica* L. dapat meningkatkan kinerja antibiotik. Penelitian ini mengisolasi senyawa alkaloid dan melihat pengaruh penambahannya terhadap zona hambat amoksisilin dan kloramfenikol terhadap *Staphylococcus aureus*.

Metode: Ekstraksi dilakukan dengan maserasi menggunakan kloroform dan soxhletasi menggunakan methanol. Fraksinasi dengan pelarut, yaitu aquadest, methanol dan etil asetat. Uji fitokimia secara kualitatif dengan melihat perubahan warna. Uji *Zone of Inhibition* (ZOI) dilakukan untuk mengetahui efek dari kombinasi fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan antibiotik terhadap *S. aureus* dengan metode *Kirby-Bauer*. Diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong, dan interpretasi hasil berdasarkan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST).

Hasil : Fraksi – fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. tunggal tidak membentuk zona bening terhadap *S. aureus*. Kombinasi fraksi alkaloid dengan kloramfenikol (F1C dan F2C) memiliki ZOI dengan rerata diameter 30.73 ± 0.9 mm dan 30.53 ± 0.55 mm, yang lebih besar dari ZOI kloramfenikol tunggal yaitu 28.6 ± 0.95 mm dan fraksi tunggal 0 ± 0 mm. Pada uji fitokimia ditemukan bahwa senyawa yang terkandung adalah alkaloid.

Simpulan: Alkaloid merupakan senyawa aktif dari *I. cylindrica* L.. Fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. bersifat potensiasi dengan antibiotik kloramfenikol terhadap *S. aureus* karena mampu meningkatkan kinerja antibiotik tersebut.

Kata Kunci: *Imperata cylindrica* L., Uji daya hambat, Amoksisilin, Kloramfenikol, Kombinasi Antibiotik.

Effects of Combination of Alkaloid Fraction from *Imperata cylindrica* L. Extract with Amoxicillin or Chloramphenicol on Inhibition of *Staphylococcus aureus*

Alma Nur Azizah, Arif Yahya, Rio Risandiansyah*

Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

Background : Alkaloids are compounds that are found in *Imperata cylindrica* L. (Reeds) and considered to be antibacterial. Methanolic extract of *I. cylindrica* L. is known to interact with several types of antibiotics. However, there are no studies that had proven that the alkaloid from *I. cylindrica* can improve the performance of antibiotics. This study isolated the alkaloid compounds and see the effect of the combination of *I. cylindrica* L. alkaloid fraction to determine the effectiveness of adding fraction of *I. cylindrica* L. alkaloid compounds to amoxicillin or chloramphenicol antibiotics against *S. aureus*.

Methods: Extraction was carried out by maceration using chloroform and soxhletation with methanol. Fractionation using aquadest, methanol and ethyl acetate as solvents. Qualitative phytochemical test done by looking at color changes. The zone of inhibition test was carried out to see the effect of the combination of *I. cylindrica* alkaloid fraction with antibiotics on bacteria using the *Kirby-Bauer* method. The diameter of the clear zone was measured using a vernier calipers, and the interpretation of the results was based on the *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST) method.

Results: Single alkaloid fractions of *I. Cylindrica* L. did not form a clear zone against *S. aureus*. The combination of alkaloid fraction with chloramphenicol (F1C and F2C) has ZOI with a mean diameter of 30.73 ± 0.9 mm and 30.53 ± 0.55 mm, which is greater than single ZOI chloramphenicol which is 28.6 ± 0.95 mm and a single fraction of 0 ± 0 mm. The compound that have been found in the phytochemical test were alkaloids.

Conclusion: Alkaloid is the active compound of *I. cylindrica* L.. The alkaloid fraction of *I. cylindrica* L. has potentiation with chloramphenicol antibiotic against *S. aureus* because it can improve the performance of the antibiotic.

Keywords: *Imperata cylindrica* L., Inhibition test, Amoxicillin, Chloramphenicol, Combination of Antibiotics.

*Correspondence author:

Rio Risandiansyah

Jl.MT. Haryono 193 Malang City, East Java, Indonesia, 65144

e-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu faktor utama penyebab kematian di dunia dengan angka kematian ± 50.000 orang per hari.¹ Besarnya angka kejadian penyakit infeksi meningkatkan penggunaan antibiotik sehingga menimbulkan permasalahan utama, yaitu resistensi bakteri. Menurut IACG, kematian akibat resistensi antimikroba (AMR) di dunia sekitar 700.000 jiwa/tahun.² Upaya mengatasi resistensi antibiotik yang dilakukan diantaranya dengan kombinasi antara dua antibiotik atau lebih, dan kombinasi antibiotik dengan herbal.³

Beberapa penelitian menemukan bahwa kombinasi antibiotik dengan herbal dapat mengatasi resistensi antibiotik tentang kombinasi antibiotik dengan herbal. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Desita, *et al* (2019) didapatkan bahwa kombinasi antibiotik amoksisilin atau kloramfenikol dengan fraksi semi polar herbal *I. cylindrica L.* terhadap *S. aureus* menunjukkan 1 fraksi yang memiliki interaksi potensias, sedangkan lainnya adalah *Not distinguishable* (tidak dapat dibedakan). Pada pengujian fitokimia dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), senyawa yang dapat diidentifikasi adalah alkaloid dan fenolik, dimana senyawa – senyawa tersebut diketahui yang memiliki aktifitas sebagai antibakteri. Pada penelitiannya tidak dilakukan isolasi senyawa murni karena konsentrasi fraksi *I. cylindrical L.* rendah, serta terjadi bias yaitu pelarut yang digunakan untuk melarutkan antibiotik tidak sesuai, sehingga menyebabkan antibiotik tidak stabil dan menyebabkan penurunan aktivitas antibiotik.⁴

Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri dengan cara menghambat penyusunan peptidoglikan pada dinding sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Alkaloid juga dapat menghambat sintesis protein bakteri. Mekanisme lain antibakteri alkaloid yaitu komponen alkaloid diketahui mampu untuk berinteraksi dengan DNA, sehingga mengganggu transkripsi dan replikasi, dan juga dapat menghambat pembelahan sel, sehingga mengakibatkan kematian sel.^{5,6,7,8}

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh atau mengisolasi fraksi senyawa alkaloid dengan cara melakukan ekstraksi dan fraksinasi untuk mengetahui efektivitas penambahan fraksi senyawa alkaloid dari *I. cylindrica L.* pada antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol. Antibiotik dan fraksi senyawa alkaloid dari *I. cylindrica L.* akan diuji dalam bentuk cakram. Pengujian sinergisme antimikroba akan dilakukan dengan metode AZDAST, yaitu dengan cara membandingkan diameter zona inhibisi dari fraksi senyawa alkaloid atau antibiotik tunggal dan kombinasi dari antibiotik dan fraksi senyawa alkaloid.⁹

METODE

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian eksperimental yang bersifat analitik laboratorik akan dilakukan secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek kombinasi fraksi senyawa alkaloid herbal *Imperata cylindrica* dengan antibiotik Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap ZOI pada *Staphylococcus aureus*. Penelitian di lakukan pada bulan Maret – Juli 2020 bertempat di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA).

Metode Pembuatan Ekstrak Alkaloid *Imperata cylindrical L.*

Ekstraksi alkaloid mengikuti metode yang digunakan oleh Bournine, *et al* (2013). Pada ekstraksi alkaloid, metode yang digunakan adalah metode maserasi. 200g simplisia *I. cylindrica L.* dilarutkan pada 2000ml kloroform (perbandingan 1:10) menggunakan *shaker waterbath* dengan kecepatan 100 – 125rpm selama 24 jam. Sisa ekstraksi (residu) hasil proses penyaringan dengan corong *buchner* dalam kondisi vakum dan dengan tiga lapis kertas filter dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C selama 1 – 2 hari. Residu disokhlletasi dengan perbandingan 1:10 menggunakan methanol, dievaporasi (dengan *rotary evaporator*) hingga pelarut hilang dan diletakkan di dalam oven dengan suhu 40°C hingga menjadi pasta.^{10,11}

Metode Pembuatan Fraksinasi Alkaloid *Imperata cylindrical L.*

Fraksinasi merupakan suatu proses pemisahan yang bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang lebih murni. Pemisahan senyawa dilakukan berdasarkan perbedaan kepolaran. Fraksinasi dilakukan dengan pengenceran menggunakan tiga jenis pelarut yaitu aquadest, methanol dan etil asetat. Hasil ekstrak alkaloid *I. cylindrica L.* dilarutkan dalam masing – masing pelarut dengan 3 kali pengulangan dengan perhitungan 1000 ppm. diambil 2 ml untuk proses ZOI dan uji fitokimia.

Metode Uji Fitokimia Fraksi – fraksi Alkaloid *Imperata cylindrical L.*

Metode uji fitokimia yang digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa alkaloid pada *Imperata cylindrica L.* adalah Uji Mayer dan *dragendorff* yang dilakukan sesuai instruksi dari kit. Fraksi alkaloid *I. cylindrica L.* dilarutkan dengan reagen amonia 0,05 N dan asam sulfat 2 N, ditambahkan pereaksi Mayer. Adanya endapan putih menunjukkan adanya senyawa alkaloid, ditambahkan pereaksi *dragendorff* ditunjukan dengan endapan jingga-merah coklat. Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan larutan ammonia encer dan dikocok akan membentuk warna kuning. Uji saponin dilakukan dengan cara dikocok kuat akan membentuk busa permanen (sekitar 15 menit). Uji

fenolik dengan cara penambahan FeCl_3 akan timbul warna biru – biru keunguan. Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan menambahkan Ac_2O dan H_2SO_4 akan timbul warna hijau – hijau kebiruan jika mengandung steroid atau timbul warna merah – merah keunguan jika mengandung terpenoid.^{11,13}

Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S.aureus* diperoleh dengan cara isolasi sendiri oleh laboratorium FK UNISMA. Bakteri *S.aureus* diidentifikasi dengan melihat karakteristik mikroskopis melalui pewarnaan gram, karakteristik koloni pada penumbuhan di media NA (MERCK; *peptone, meat extract* dan *agar – agar*) dan MSA (MERCK; *Pancreatic Digest of Casein, Peptic Digest of Animal Tissue, Beef Extract, D-Mannitol, NaCl*, dan *Phenol Red*), dan uji katalase. Bakteri berbentuk kokus seperti buah anggur. Pada media NA, koloni berbentuk sirkuler dan berwarna kuning keemasan. Hasil uji *mannitol fermenting* (+) dan katalase (+). Bakteri *S.aureus* diambil dari media padat. Ditumbuhkan pada media Nutrient Broth kemudian simpan pada inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C hingga didapatkan media keruh. Isolate bakteri di ditumbuhkan pada media Nutrient. Setiap cawan petri diambil 1 oshe bakteri. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml NaCl 0,9% steril hingga keruh. Diambil 1 ml untuk dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm dan diencerkan menggunakan NaCl 0,9% steril sesuai dengan nilai absorbansi dan sesuai dengan standart 0.5 Mc Farland (0.1 – 0.2).^{9,11}

Menentukan Zone of Inhibition (ZOI) Tunggal dan Kombinasi

Pengujian ZOI dilakukan dengan metode difusi cakram atau metode Kirby Baure. Cakram yang berisi fraksi herbal tunggal, antibiotik tunggal dan kombinasi dari keduanya diletakkan pada media agar yang telah ditanami bakteri yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan bakteri permukaan media agar. Cakram terdiri dari 3 pelarut fraksi, 3 fraksi senyawa alkaloid *I. cylindrica* L. tunggal, antibiotik amoksisilin dan kloramfenikol tunggal, dan kombinasi di letakkan pada dasar cawan petri. Media padat MHA (HiMedia; *Acicase* dan *Starch*) di tuangkan pada cawan petri yang telah ditanam cakram. Bakteri di ratakan menggunakan spreader ketika media telah menjadi padat. Dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Hambatan pertumbuhan bakteri pada media agar ditandai dengan adanya area bening (*clear zone*) pada sekitar cakram.^{9,11}

Metode Penentuan Interaksi

Penentuan interaksi berdasarkan hasil ZOI tersebut diukur dengan metode AZDAST (*Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test*). Inokulum

disiapkan dari suspensi koloni yang telah dibuat menggunakan swab steril. Antibiotik maupun fraksi herbal dalam bentuk cakram (paper disk) di masukkan dalam media padat MHA yang telah di autoclave dan di tanam pada dasar dari cawan petri. Cawan petri dibuat dalam 9 uji yang berisi fraksi tunggal, antibiotik amoksisilin tunggal, antibiotik kloramfenikol tunggal, kombinasi fraksi dengan antibioik amoksisilin, dan kombinasi fraksi dengan antibiotik kloramfenikol, dan kontrol pelarut fraksi yang akan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Interpretasi hasil ZOI disesuaikan dengan interpretasi hasil metode AZDAST, pada Tabel 1 berikut ini;⁹

Tabel 1. Interpretasi Hasil dari Metode AZDAST

No.	Hasil kombinasi pada cawan petri AZDAST	Interpretasi kombinasi
1	Jika $\text{AB} > \text{A} \ \& \ \text{B}$, dan lebih kecil/besar dari pada AA dan/atau BB	Sinergis
2	Jika salah satu dari A atau $\text{B} = 0$ dan $\text{AB} > \text{A} \ \& \ \text{B}$	Potensi (meningkat)
3	Jika $\text{AB} < \text{A} \ \& \ \text{B}$	Antagonis
4	Jika $\text{AB} = \text{AA}$ dan/atau BB	Aditif
5	Jika $\text{AB} = \text{A/B}$	Not distinguishable

Keterangan : A = Antibiotik 1; B = Antibiotik 2; AB = Kombinasi antibiotik 1 dan 2.

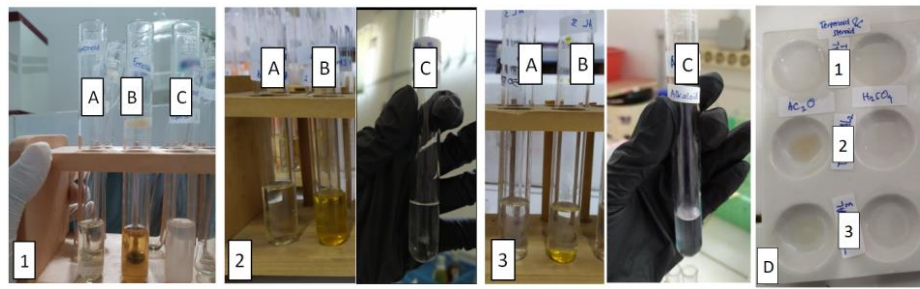
Analisa Data Statistik

Analisa data statistik dilakukan dengan mengukur hasil *Zone of Inhibition* (ZOI) tunggal dan kombinasi menggunakan jangka sorong dan dimasukkan pada *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) untuk mendapatkan rata – rata dan standar deviasi. Pengujian statistic data dilakukan dengan menggunakan uji statistic *Mann-Whitney* atau *One-Way ANOVA*. Jika nilai signifikansi $p\text{-value} < 0,05$, data berdistribusi normal dan homogen, maka menggunakan *One-Way ANOVA* dan metode *Mann-Whitney* apabila hasil tidak normal atau tidak homogen.

HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan uji yang di lakukan untuk menentukan kandungan senyawa aktif pada fraksi alkaloid Alang – alang. Pengujian dilakukan dengan penambahan reagen – reagen sesuai dengan senyawa yang ingin di deteksi dan akan berubah warna jika positif mengandung senyawa tersebut.¹² Hasil uji fitokimia fraksi alkaloid alang – alang, dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 2 berikut ini:



Gambar 1. Hasil Uji Fitokimia pada Fraksi – fraksi Alkaloid *I. cylindrica*

Ket: 1. Fraksi 1; 2. Fraksi 2; 3. Fraksi 3; A. Flavonoid; B. Fenolik; C. Alkaloid; D. Steroid dan Terpenoid.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia

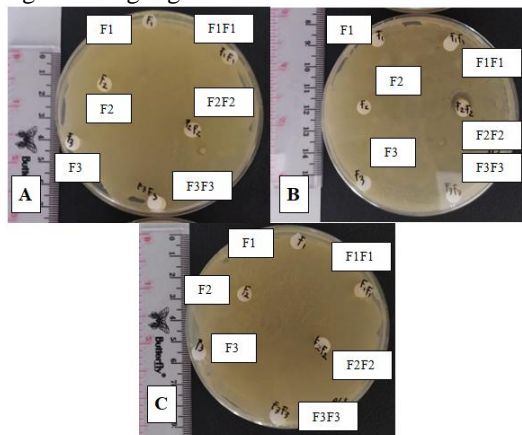
Uji Fitokimia	Hasil		
	F1	F2	F3
Flavonoid	–	–	–
Alkaloid (Uji Mayer)	+	+	+
Alkaloid (Uji Dragendorff)	–	–	–
Fenolik	–	–	–
Saponin	–	–	–
Terpenoid	–	–	–
Steroid	–	–	–

Ket: tanda + : Terdapat perubahan; tanda – : Tidak terdapat perubahan

Gambar 1 dan **Tabel 2** menunjukkan bahwa pada uji alkaloid, setelah dilakukan penambahan reagen Mayer pada setiap fraksi terbentuk endapan putih. Pada uji saponin, ketika dilakukan pengocokan pada fraksi – fraksi alkaloid, tidak ada buih (busa) yang terbentuk permanen. Pada flavonoid tidak ada perubahan warna yang terjadi setelah pemberian larutan ammonia encer. Setelah dilakukan penambahan Ac_2O dan H_2SO_4 untuk pengujian terpenoid dan steroid, tidak ditemukan adanya perubahan warna pada setiap fraksi alkaloid *I. cylindrica* L.

Hasil Pengukuran ZOI Fraksi - fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. Tunggal pada *S. aureus*

Pada **Gambar 2** menunjukkan hasil uji ZOI fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. secara tunggal terhadap *S. aureus*. Pengukuran dilakukan dengan jangka sorong digital.



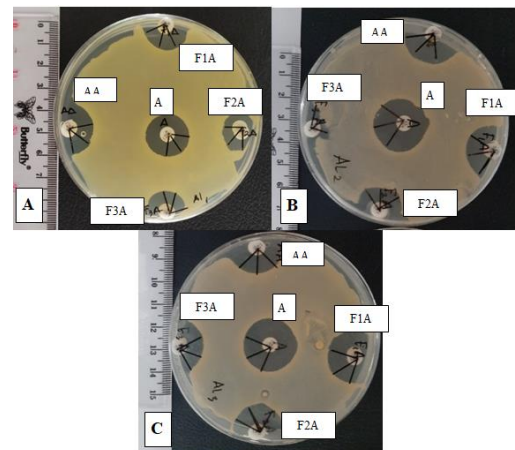
Gambar 2. Hasil ZOI Tunggal Fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. terhadap *S. aureus*

Ket: A. Pengukuran ZOI Fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. terhadap *S. aureus* pengulangan 1, F1= Fraksi 1 tunggal (dengan pelarut aquadest), F2 = Fraksi 2 tunggal (dengan pelarut methanol), F3=Fraksi 3 tunggal (dengan pelarut etil asetat), FxFx = Fraksi ganda; B. Pengulangan 2; C. Pengulangan 3.

Berdasarkan **Gambar 2**, hasil pengujian fraksi – fraksi alkaloid dari *I. cylindrica* L. terhadap *s. aureus* tidak menunjukkan adanya zona inhibisi yang terbentuk pada semua fraksi yang diteliti. Hal ini menunjukkan bahwa secara tunggal fraksi tidak dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*.

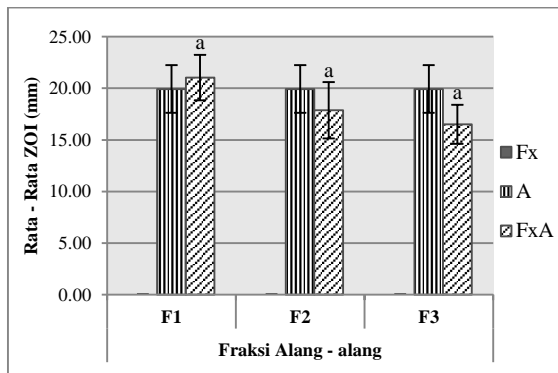
Hasil Uji ZOI Kombinasi Fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. dengan Amoksisilin pada *S. aureus*

Hasil pengukuran Zone of Inhibition (ZOI) kombinasi fraksi – fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin terhadap *S. aureus* dapat dilihat pada **Gambar 3** dan **Tabel 3**. Rerata yang diperoleh dari 3 kali pengulangan kemudian dilakukan uji statistik non parametric Mann-Whitney Test dan ditentukan interpretasi hasilnya berdasarkan metode AZDAST.



Gambar 3. Hasil ZOI Kombinasi Fraksi – fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. dan Amoksisilin terhadap *S. aureus*

Ket: A. Pengukuran ZOI kombinasi fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin terhadap *S. aureus* pengulangan 1, A = Amoksisilin tunggal, AA = Amoksisilin ganda, F1A = Fraksi 1 alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin, F2A = Fraksi 2 alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin, F3A = Fraksi 3 alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin; B. Pengulangan 2; C. Pengulangan 3.



Gambar 4. Perbandingan ZOI Fraksi – fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. Tunggal, Amoksisilin Tunggal, dan Kombinasi terhadap *S.aureus*

Ket: Fx = uji zoi tunggal fraksi alkaloid dari alang – alang; A = amoksisilin tunggal; FxA = kombinasi fraksi alkaloid dari *I.cylindrica* L. dengan amoksisilin; a = berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap Fx

Tabel 3. Kombinasi Fraksi – fraksi Alkaloid *I.cylindrica* L. dengan Amoksisilin terhadap *S.aureus*

Sampel	Rata – rata \pm SD	Jenis Interaksi
F1	0 ± 0	Not distinguishable
F1F1	0 ± 0	
A	19.93 ± 2.31	
AA	20.57 ± 1.19	
F1A	$21.03 \pm 2.21(a)$	
F2	0 ± 0	Not distinguishable
F2F2	0 ± 0	
A	19.93 ± 2.31	
AA	20.57 ± 1.19	
F2A	$17.87 \pm 2.72(a)$	
F3	0 ± 0	Not distinguishable
F3F3	0 ± 0	
A	19.93 ± 2.31	
AA	20.57 ± 1.19	
F3A	$16.5 \pm 1.9(a)$	

Ket: Fx = uji zoi tunggal fraksi alkaloid dari alang – alang; FxFx = uji zoi ganda fraksi alkaloid dari alang – alang; A = amoksisilin tunggal; AA = amoksisilin ganda; FxA = kombinasi fraksi alkaloid dari *I.cylindrica* L. dengan amoksisilin; SD = Standart Deviasi a = berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap Fx.

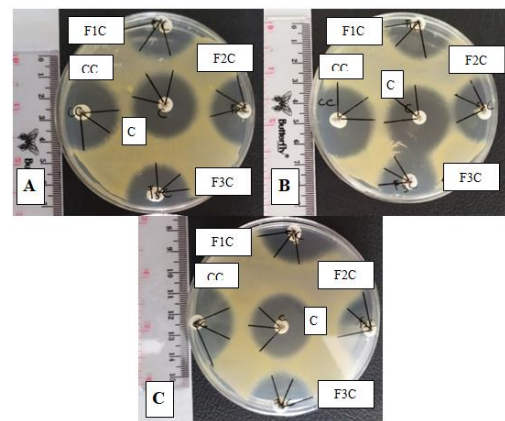
Pada **Gambar 3, Gambar 4, dan Tabel 3** menunjukkan hasil pengujian kombinasi fraksi – fraksi alkaloid *I.cylindrica* L. dengan amoksisilin terhadap *s.aureus* yang menunjukkan bahwa pada ZOI F1A lebih besar daripada ZOI amoksisilin tunggal. Sedangkan pada kombinasi lainnya tidak menunjukkan adanya peningkatan zona inhibisi yang terbentuk jika dibandingkan dengan ZOI amoksisilin tunggal. Hal ini menunjukkan bahwa secara kombinasi, hanya F1A saja yang menunjukkan adanya peningkatan diameter zona inhibisi pada *S.aureus*.

Jenis interaksi berdasarkan metode AZDAST dengan cara membandingkan diameter masing – masing sampel. **Tabel 3** menunjukkan jenis interaksi antara amoksisilin tunggal, fraksi alkaloid

I.cylindrica L. tunggal dan kombinasi. Kombinasi F1A menunjukkan hasil bahwa ZOI kombinasi lebih besar ($21.03 \pm 2.21\text{mm}$) daripada ZOI tunggal ($19.93 \pm 2.31\text{ mm}$). Sedangkan kombinasi F2A dan F3A menunjukkan bahwa ZOI kombinasi tidak lebih besar dari ZOI tunggal. Namun, setelah dilakukan uji kombinasi fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin menggunakan uji statistik non parametric *Mann-Whitney Test*, hasil yang diperoleh tidak signifikan ($p > 0.05$) pada seluruh fraksi, sehingga jenis interaksi tidak dapat dibedakan (*not distinguishable*).

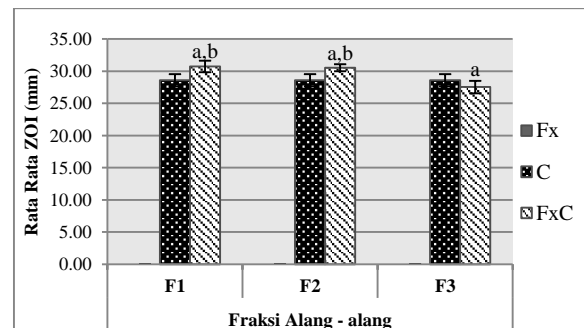
Hasil Uji ZOI Kombinasi Fraksi Alkaloid *I.cylindrica* L.dengan Kloramfenikol pada *S.aureus*

Hasil pengukuran *Zone of Inhibition* (ZOI) serta hasil interaksi kombinasi fraksi – fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol terhadap *S.aureus* dapat dilihat pada **Gambar 4** dan **Tabel 4** berikut ini;



Gambar 5. Hasil ZOI Kombinasi Fraksi Alkaloid *I.cylindrica* L. dan Kloramfenikol terhadap *S.aureus*

Ket: A. Pengukuran ZOI kombinasi fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol terhadap *S.aureus* pengulangan 1, CC = Kloramfenikol ganda, C = Kloramfenikol tunggal, F1C = Fraksi 1 alkaloid *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol, F2C = Fraksi 2 alkaloid *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol, F3C = Fraksi 3 alkaloid *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol; B. Pengulangan 2; C. Pengulangan 3.



Gambar 6. Perbandingan ZOI Fraksi – fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. Tunggal, Kloramfenikol Tunggal, dan Kombinasi terhadap *S.aureus*

Ket: Fx = fraksi tunggal alkaloid *I. cylindrica* L.; C = kloramfenikol tunggal; FxC = kombinasi fraksi alkaloid *I.cylindrica* L. dengan kloramfenikol; SD = Standart Deviasi; a =

berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap Fx; b = berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap C.

Tabel 4. Hasil Interaksi ZOI Kombinasi Fraksi – fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. dengan Kloramfenikol terhadap *S.aureus*

Sampel	Rata – rata \pm SD	Jenis Interaksi
F1	0 ± 0	
F1F1	0 ± 0	
C	28.6 ± 0.95	Potensiasi
CC	32.57 ± 1.46	
F1C	$30.73 \pm 0.9(a,b)$	
F2	0 ± 0	
F2F2	0 ± 0	
C	28.6 ± 0.95	Potensiasi
CC	32.57 ± 1.46	
F2C	$30.53 \pm 0.55(a,b)$	
F3	0 ± 0	
F3F3	0 ± 0	
C	28.6 ± 0.95	Not
CC	32.57 ± 1.46	distinguishable
F3C	$27.53 \pm 0.97(a)$	

Ket: Fx = ZOI tunggal fraksi alkaloid *I. cylindrica* L.; FxFx = uji ZOI fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. ganda; C = kloramfenikol tunggal; CC = kloramfenikol ganda; FxC = kombinasi fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol; SD = Standart Deviasi; a = berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap Fx; b = berbeda signifikan ($p < 0.05$) terhadap C.

Berdasarkan **Gambar 5**, **Gambar 6** dan **Tabel 4**, dapat diketahui hasil pengujian kombinasi fraksi – fraksi alkaloid dari *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol terhadap *S.aureus* yang menunjukkan bahwa ZOI pada kombinasi F2C dan F3C lebih besar daripada ZOI kloramfenikol tunggal. Sedangkan pada kombinasi F3C tidak menunjukkan adanya peningkatan zona inhibisi yang terbentuk jika dibandingkan dengan ZOI kloramfenikol tunggal. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi F1C dan F2C menunjukkan adanya peningkatan diameter zona inhibisi pada *S.aureus*.

Tabel 4 menunjukkan jenis interaksi antara kloramfenikol tunggal, fraksi tunggal dan kombinasi. Kombinasi F1C dan F2C menunjukkan interaksi potensiasi karena ZOI kombinasi terbentuk lebih besar daripada ZOI tunggal. Didapatkan hasil signifikan ($p < 0.05$) pada F1 dan F2 terhadap C dan Fx, sedangkan F3 tidak signifikan ($p > 0.05$) terhadap C sehingga kombinasi F3C menunjukkan jenis interaksi *not distinguishable*.

PEMBAHASAN

Kandungan Senyawa Aktif Hasil Uji Fitokimia pada Fraksi – fraksi Ekstrak Alkaloid *Imperata cylindrica* L.

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif yang digunakan untuk identifikasi kandungan senyawa aktif dalam tanaman herbal atau sampel. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil sedikit fraksi – fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dan ditambahkan

reagen sesuai dengan senyawa yang akan diidentifikasi.¹³ Pada fraksi – fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. mengandung senyawa alkaloid yang ditunjukkan dengan adanya endapan putih setelah dilakukan penambahan reagen Mayer.¹⁴ Reaksi uji alkaloid menggunakan reagen Mayer dapat terjadi antara elektron atom nitrogen yang bereaksi dengan kalium tetraiodomerkurat(II) ($K_2 [HgI_2]$) sehingga terbentuk kompleks kalium-alkaloid yang membentuk presipitat putih.¹⁵ Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lalthanpuui (2018), disebutkan bahwa pada *I. cylindrica* L. mengandung senyawa alkaloid dengan.¹⁶ Namun, hanya sedikit penelitian yang mengidentifikasi jenis alkaloid pada tanaman *I. cylindrica* L.

Metode isolasi senyawa alkaloid yang telah dilakukan berhasil. Maserasi dengan menggunakan pelarut kloroform dapat menarik senyawa nonpolar sehingga pada residu simplisia hanya terdapat senyawa polar, yaitu alkaloid. Kemudian dilakukan metode soxhletasi dengan menggunakan pelarut methanol untuk menarik senyawa alkaloid dari residu *I. cylindrica* L. dengan perbandingan 1:10.¹⁰ Pelarut polar yang digunakan pada fraksinasi dapat mengikat senyawa alkaloid. Sesuai dengan prinsip 'like dissolved like', pelarut polar (methanol, aquadest), dan pelarut semipolar (etil asetat) dapat menarik alkaloid yang bersifat polar.^{17, 18}

Pengaruh Fraksi – fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. Tunggal pada *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan hasil pengukuran *Zone of Inhibition* (ZOI) didapatkan bahwa fraksi – fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. secara tunggal tidak dapat menghambat pertumbuhan dari *S.aureus*. Menurut Gurrapu dan Mamidala (2017), aktivitas antibakteri isolasi senyawa alkaloid dari daun *Eclipta alba* memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap *S. aureus* dimana pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$, terbentuk zona hambat 16.5 ± 0.02 mm dari alkaloid. Semakin besar pula zona inhibisi yang terbentuk.¹⁹

Tidak terbentuknya zona bening ini dapat dipengaruhi oleh beberapa hal. Konsentrasi kandungan senyawa alkaloid (1mg/ml dan 2mg/ml) tidak dapat bekerja dengan efektif untuk menghambat pertumbuhan dan melisis bakteri *S. aureus*, karena menurut Cordell (2001), alkaloid mampu bekerja sebagai antibakteri dengan menghambat integritas komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri dan dapat menghambat sintesis protein bakteri.⁵

Jenis alkaloid yang terkandung dalam *I. cylindrica* L. tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri juga dapat menjadi salah satu penyebab. Beberapa jenis alkaloid juga memiliki aktivitas sebagai analgesik (misalnya kodein), stimulan saraf pusat (misalnya brusin), depresan saraf pusat (misalnya morfin), antihipotensi (misalnya efedrin),

antikolinergik (misalnya atropin), antiemetik (misalnya skopolamin), antitumor (misalnya vinblastin) dan antimalaria (misalnya kina).²⁰ Ketebalan media agar MHA juga dapat mengakibatkan tidak terbentuknya ZOI karena dapat mempengaruhi difusi dari zat uji ke dalam agar dan diameter zona hambat.²¹

Pengaruh Kombinasi Fraksi Alkaloid *I. cylindrica* L. dengan Amoksisilin atau Kloramfenikol terhadap *Staphylococcus aureus*

Hasil pengukuran ZOI pada kombinasi fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin menunjukkan bahwa semua kombinasi memiliki jenis interaksi *Not distinguishable* atau tidak dapat dibedakan. Dikatakan *Not distinguishable* yaitu apabila hasil pengukuran ZOI kombinasi dibandingkan dengan antibiotik tunggal memiliki nilai rerata yang sama dan memiliki hasil yang tidak signifikan ($p > 0.05$). Hal ini dapat terjadi karena hasil perolehan konsentrasi alkaloid yang rendah ketika proses fraksinasi serta ketebalan media agar yang dibentuk.

Pada kombinasi fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol terhadap *S. aureus* menunjukkan bahwa F1C dan F2C memiliki interaksi potensiasi. Dikatakan potensiasi karena adanya peningkatan rerata ZOI kombinasi dibandingkan dengan kloramfenikol tunggal, dengan nilai fraksi tunggal 0 dan memiliki hasil yang signifikan ($p < 0.05$). Sedangkan, pada kombinasi fraksi 3 alkaloid (F3C), menunjukkan hasil interaksi *Not distinguishable* (tidak dapat dibedakan) karena data tidak signifikan ($p > 0.05$).

Kloramfenikol merupakan agen bakteriostatik dan bekerja dengan menghambat 23S rRNA, dan transkripsi dengan mencegah reaksi *peptidil transferase*. Penghambatan transkripsi tersebut mencegah pengikatan tRNA aminoasil ke situs 50S ribosom, sehingga mengganggu sintesis protein sel bakteri.²² Berdasarkan hasil CLSI, hal ini menunjukkan bakteri *S. aureus* yang digunakan bersifat sensitif, karena amoksisilin dan kloramfenikol mampu menghambat pertumbuhan dari *S. aureus*. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar cakram dengan diameter 28.6 ± 0.95 mm, dimana menurut NCCLS, diameter zona hambat ≥ 18 mm termasuk kategori sensitif.²³ Namun, perlu diperhatikan bahwa bakteri yang digunakan adalah hasil isolasi oleh Laboratorium dan bukan bakteri standar sehingga diduga isolate *S. aureus* yang diperoleh bukan bakteri yang memiliki sifat resisten terhadap antibiotik.

Dari hasil yang diperoleh, penambahan fraksi alkaloid pada antibiotik kloramfenikol mampu meningkatkan kinerja dari kloramfenikol. Alkaloid yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri diantaranya adalah *reserpine*, *halocyanine A*, *eudistomin E*, *dragmacidin D*, *chelonin A*, *caulerpin*, *vincamine* dan *barberine*.²⁴

Mekanisme alkaloid meningkatkan kinerja kloramfenikol yang memungkinkan, yaitu karena adanya gugus (OH) pada struktur alkaloid dapat meningkatkan aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengubah sifat protein sel (denaturasi) menyebabkan lisisnya dinding sel bakteri. Dinding sel yang tidak terbentuk secara utuh akan memudahkan masuknya kloramfenikol ke dalam bakteri.¹⁹

Menurut Cordell (2001), alkaloid memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis protein bakteri.⁵ Hal ini juga dapat menjadi kemungkinan mekanisme kerja alkaloid dalam meningkatkan kinerja kloramfenikol karena memiliki mekanisme kerja yang sama. Hal yang serupa ditemukan pada interaksi antibiotik *vancomycin* dan *colistin*, yang memiliki target kerja yang sama yaitu menghambat sintesis dinding sel pada bakteri *S. aureus*.²⁵ Namun, mekanisme pasti dari cara alkaloid menghambat sintesis protein masih belum diketahui sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk menemukan mekanisme interaksi potensiasi fraksi alkaloid dari *I. cylindrica* L. dengan kloramfenikol.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Metode ekstraksi yang dilakukan dapat memperoleh senyawa alkaloid *I. cylindrica* L..
2. Fraksi – fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. secara tunggal tidak mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*.
3. Interaksi antara fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. dengan amoksisilin terhadap *S. aureus* tidak dapat dibedakan atau *not distinguishable*.
4. Interaksi antara fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. yang dilarutkan dengan aquadest (F1) dan methanol (F2) dengan kloramfenikol bersifat potensiasi terhadap *S. aureus*.

SARAN

Adapun saran untuk meningkatkan dan mengembangkan penelitian ini lebih lanjut adalah:

1. Melakukan uji fitokimia secara kuantitatif serta mengidentifikasi golongan senyawa alkaloid yang terdapat pada *I. cylindrica* L..
2. Melakukan isolasi *pure compound* senyawa alkaloid murni.
3. Melakukan penghitungan dosis efektif penambahan fraksi alkaloid *I. cylindrica* L. pada kloramfenikol terhadap *S. aureus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang telah mendanai penelitian, Laboratorium

Mikrobiologi FK UNISMA dan teman-teman kelompok penelitian yang telah bekerjasama dalam penelitian dari awal hingga akhir.

DAFTAR PUSTAKA

1. Blesson J, Saji C V, Nivya RM, Kumar R. Synergistic antibacterial activity of natural plant extracts and antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **World J Pharm Pharm Sci.** 2015;4(03):741–63.
2. Ad hoc Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. No Time To Wait: Securing The Future From Drug-Resistant Infections. **IACG Terms of Reference.** April, 2019.
3. Worthington RJ, Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. **Trends Biotechnol.** 2013;31(3):177–84.
4. Desita R, Risandiansyah R, Fadli M. Z. Efek Penambahan Fraksi Semi Polar (F1-F10) Ekstrak Metanol Alang – alang pada Daya Hambat Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. **Bio Komplementer Med.** 2019;6(3):230–9.
5. Cordell GA, Quinn-Beattie M Lou, Farnsworth NR. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. **Phyther Res.** 2001;15(February):183–205.
6. Halevy AH, Levy A. Alkaloid. **Encyclopaedia Britannica, Inc.** 2020. p. 5-8.
7. Darsana, I. G. O. Potensi Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara In Vitro. **Indonesia Medicus Veterinus**, 2012;1(3), 337 – 351
8. Gorlenko CL, Kiselev HY, Budanova E V., Zamyatin AA, Ikryannikova LN. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: New heroes or worse clones of antibiotics? **Antibiotics.** 2020;9(4).
9. Ziaei-Daroukalei N, Ameri M, Zahraei-Salehi T, Ziaei-Daroukalei O, Mohajer-Tabrizi T, Bornaei L. AZDAST the new horizon in antimicrobial synergism detection. **Methods X.** USA: **National Center for Biotechnology Information.** 2016;3(232):43–52.
10. Bournine L, Bensalem S, Wauters JN, Iguer-Ouada M, Maiza-Benabdesselam F, Bedjou F, et al. Identification and quantification of the main active anticancer alkaloids from the root of *glaucium flavum*. **Int J Mol Sci.** 2013;14(12):23533–44.
11. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. **Am Soc Microbiol.** 2016;(December 2009):1–13.
12. Mondong FR, Sangi MS, Kumaunang M. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia prunifolia* Jacq.) dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L.) Herb). **J MIPA UNSRAT ONLINE.** 2015;4(1):81.
13. Habibi AI, Firmansyah RA, Setyawati SM. Skrining Fitokimia Ekstrak n-Heksan Korteks Batang Salam (*Syzygium polyanthum*). **Indones J Chem Sci.** 2018;7(1):1–4.
14. Sirait, M. Penuntun Fitokimia Dalam Farmasi'. Bandung: ITB Press; 2007.
15. Warsi, Sholichah AR. Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanolic extract and ethyl acetate fraction from basil leaf (*Ocimum basilicum* L.) by DPPH radical scavenging method. **IOP Conf Ser Mater Sci Eng.** 2017;259(1).
16. Lalthanpui PB, Zarzokimi, Lalchandama K. *Imperata cylindrica*: a noxious weed of pharmacological potentials. **Advances in Engineering Research.** 2018; 178(Msc):173–7.
17. Husni E, Dachriyanus, Saputri Vw. Penentuan Kadar Fenolat Total, Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri dari Ekstrak dan Fraksi Kulit Batang Bintangor (*Calophyllum Soulatri* Burm.F). **J Sains Farm Klin.** 2020;7(1):92–8.
18. Mubarak Z, Chismirina S, Daulay HH. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis Alami dari Sarang Lebah terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. **J Syiah Kuala Dent Soc.** 2016;1(2):175–86.
19. Gurrapu S, Mamidala E. In vitro antibacterial activity of alkaloids isolated from leaves of *Eclipta alba* against human pathogenic bacteria. **Pharmacogn J.** 2017;9(4):573–7.
20. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **Int J Antimicrob Agents.** 2014;44(5):377–86
21. Kirmusaoğlu S, Gareayaghi N, S. Kocazeybek B. Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. **Antimicrob Antibiot Resist Antibiofilm Strateg Act Methods.** 2019;1–9.
22. Dey P, Kundu A, Kumar A, Gupta M, Lee BM, Bhakta T, et al. Analysis of Alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In: *Recent Advances in Natural Products Analysis.* Elsevier Inc.; 2020. p. 505–67.

23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Pennsylvania: NCCLS. 2005.
24. Bollenbach T. Antimicrobial interactions: Mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Curr Opin Microbiol.** 2015;27:1–9.